Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H.A. Hirsch

α_1-Antitrypsin-Titer im Serum im Verlauf der ungestörten Gravidität

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Archibald Fridrich
aus Stuttgart

1981

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H.A. Hirsch

α_1-Antitrypsin-Titer im Serum im Verlauf der ungestörten Gravidität

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Archibald Fridrich
aus Stuttgart

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. G. Rassner
Berichterstatter: Professor Dr. V. Unbehaun
(Professor Dr. H.A. Hirsch)

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Genetische Grundlagen des α_1-Antitrypsins	3
III.	α_1-Antitrypsin-Titeränderungen bei verschiedenen Erkrankungen	5
IV.	α_1-Antitrypsin-Stellung im Gerinnungssystem	7
V.	α_1-Antitrypsin im Verlauf der Gravidität	9
VI.	Trypsinbestimmung mit BAPNA	12
VII.	Weitere Einflüsse des Humanserums auf Tryptische und Antitryptische Aktivitäten	18
VIII.	α_1-Antitrypsin-Bestimmung mit der oben beschriebenen Methode	20
IX.	Berechnung der Trypsinhemmenden Kapazität nach Trautschold	28
X.	Ergebnisse	30
XI.	Diskussion	34
XII.	Zusammenfassung	35
XIII.	Literaturverzeichnis	36

I. Einleitung

Unter physiologischen Bedingungen wird die Hämostase von prokoagulatorischen und antikoagulatorischen Valenzen in einem dynamischen Gleichgewicht gehalten.

Bestandteil dieses Gleichgewichts ist das Fibrolysinsystem, das als Gegenspieler des Koagulationsmechanismus wirkt, in dem seinerseits die Fibrinolyseaktivierung durch Kinaseinhibitoren beeinflußt wird.

Unter diesen Kinaseinhibitoren kommt

a) dem α_2-Makroglobulin und

b) dem α_1-Antitrypsin

besondere Bedeutung zu.

Die Kaskade biochemischer Reaktionen führt in diesen Systemen zur Bildung des "aktiven Faktors" in Form eines Enzyms. Dabei handelt es sich um Proteinasen, deren Aktivität wiederum durch Inhibitoren kontrolliert wird. Das eingangs skizzierte dynamische Gleichgewicht des hämostatischen Potentials resultiert aus der Summe einer Vielzahl solcher Enzymaktivitäten und ihrer Hemmung.

Aufgrund der hohen Aktivität dieser Enzymsysteme sind im Blut Hemmstoffe nötig, die diese Enzyme binden können. Damit wird eine überschießende Reaktion der oben genannten Systeme normalerweise verhindert. Diese Hemmstoffe sind Proteine, welche die Fähigkeit besitzen, Proteinasen zu hemmen. Sie werden darum als Proteinaseninhibitoren bezeichnet. Sie binden die betreffenden Proteinasen in einer meist reversiblen Reaktion in einem Enzym-Inhibitor-Komplex. Dabei wird die Aktivität des Enzyms gegenüber seinem Substrat vollständig oder teilweise blockiert. Die meisten dieser Proteinaseninhibitoren sind polyvalent, d.h. sie können mehrere Enzyme hemmen. Bestimmt und bezeichnet werden sie nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit.

Frühzeitig wurden Antitrypsin- und Antiplasmin-Aktivitäten im Humanserum entdeckt, so daß diese Systeme heute relativ gut untersucht sind. Bis heute sind sechs Proteinase-Inhibitoren im menschlichen Serum isoliert und charakterisiert worden:[61,28,20,30]

1) α_1-Antitrypsin	(Mol.Gew. 54.000)
2) Inter-α-Trypsininhibitor	(Mol.Gew. 150.000)
3) α_2-Makroglobulin	(Mol.Gew. 820.000)
4) α_1-Antichymotrypsin	(Mol.Gew. 69.000)
5) Antithrombin III	(Mol.Gew. 65.000)
6) C $\bar{1}$-Elastase-Inaktivator	(Mol.Gew. 104.000)

Bei allen Proteinase-Inhibitoren handelt es sich um Glykoproteine, die bis auf das α_1-Antichymotrypsin polyvalent wirken. Sie werden in sofort wirkende und ansteigend wirkende Inhibitoren (Progressivinhibitoren) eingeteilt:

a) Im Blutgerinnungssystem spielen nach heutiger Kenntnis hauptsächlich das α_1-Antitrypsin, das α_2-Makroglobulin und Antithrombin III eine Rolle. Im Serum sind sie im Überschuß vorhanden und können so vor einer übermäßigen Fibrinolyse schützen.
b) α_1-Antitrypsin und Antithrombin III werden zu den Progressiv-Inhibitoren, α_2-Makroglobulin zu den Sofort-Inhibitoren gezählt.[20]

α_1-Antitrypsin hemmt Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Kallikrein und Plasmin. (Vgl. Kapitel: α_1-Antitrypsin im Verlauf der Gravidität)
α_2-Makroglobulin hemmt als Sofortinhibitor Plasmin, Trypsin, Chymotrypsin und Elastase, als Progressivinhibitor Thrombin.
Antithrombin III hemmt Thrombin, Trypsin und Plasmin.

Diese Proteinase-Inhibitoren haben einen erheblichen Einfluß auf die Blutgerinnung, wobei dem α_1-Antitrypsin mit 90 % der gesamten Antiproteinasen-Aktivität eine besondere Stellung eingeräumt wird.

II. Genetische Grundlagen des α_1-Antitrypsins

Aus der Vorstellung heraus, daß die Steuerung der α_1-Antitrypsin-Synthese von einem einzigen Genpaar vorgenommen wird ("Ein Gen-Ein Enzym - Hypothese"), entstand die Einteilung in die drei daraus resultierenden Zustände:

1) Normaler α_1-Antitrypsingehalt (α_1-AT-Gehalt 100 %)
2) Heterozygoter α_1-Antitrypsinmangel (α_1-AT-Gehalt 50 %)
3) Homozygoter α_1-Antitrypsinmangel (α_1-AT-Gehalt 10-15 %)

Andere α_1-Antitrypsin-Phänotypen konnten mit der enzymatischen Methode und den Immunodiffusionen nicht unterschieden werden, bis durch die grundlegenden Arbeiten von Fagerhol[17,19] klar wurde, daß es mehrere kodominante Allele sein müssen, die das α_1-Antitrypsin-System steuern. Heute sind mindestens 11 dieser kodominanten Allele gesichert, nach anderen Autoren bis zu 23 verschiedene Allele bekannt.

Die von Laurell[43] und Fagerhol verwendete Kombination der Stärke-Gel-Technik mit der Zweidimensional-Immunelektrophorese erlaubte es, verschieden schnell laufende Proteinaseinhibitor-Fraktionen aufzutrennen. Auf Vorschlag von Fagerhol wurde, da das α_1-Antitrypsin den größten Anteil an den Proteinase-Inhibitoren ausmacht, dieses System mit "PI" (Proteinase-Inhibitor) abgekürzt.

Hinter der Kurzbezeichnung "PI" werden nun die Abkürzungen der einzelnen Proteinfraktionen gesetzt, z.B. F für die schnell laufende (fast), M für die mittlere (medium), S für die langsame (slow) und Z für die ultra langsame (ultra slow) Beweglichkeit.

Hier zeigte sich, daß der früher sogenannte "klassische", von Laurell und Eriksson[44,12] beschriebene "homozygote" α_1-Antitrypsin-Mangel als PI ZZ-Typ klassifiziert werden mußte, bei dem ein familiäres Lungenemphysem und familiä-

re juvenile Leberzirrhosen auftreten. Zumindest für die juvenile Leberzirrhose wird angenommen, daß es sich bei den PAS-positiven Einschlüssen in der Leber um einen Defekttyp des α_1-Antitrypsins handelt[48], welchem im Gegensatz zum PI MM-Typ eine terminale Neuraminsäure fehlt. Es wird ein Neuraminsäuretransferasedefekt diskutiert[38,14,8].

J.P. Martin[49] versucht in einer Übersichtsarbeit, die verschiedenen Typen des Proteinase-Inhibitoren-Systems mit den bereits beschriebenen Krankheitsbildern zu korrelieren.

III. α_1-Antitrypsin-Titeränderungen bei verschiedenen Erkrankungen

Die α_1-Antitrypsin-Serumspiegel verändern sich bei verschiedenen Krankheitszuständen sowohl nach oben wie auch nach unten von den sowieso schon stark schwankenden Normalwerten. Um diese unterschiedlichen Ausgangstiter bei den Untersuchungen über die α_1-Antitrypsin-Veränderungen während der Gravidität zu kennen, ist es erforderlich, auf die Krankheitsbilder einzugehen, die normalerweise mit einer Veränderung des α_1-Antitrypsin-Gehaltes einhergehen.

Am bekanntesten ist wohl das erstmals von Laurell und Eriksson[45] beschriebene Lungenemphysem bei "homozygotem" α_1-Antitrypsin-Mangel (Phänotyp PI ZZ)[46,42]. Dieses sehr seltene Krankheitsbild kann schon im jugendlichen Alter stark ausgeprägt sein, was möglicherweise auf eine Art "proteolytische Selbstverdauung"[32] durch Makrophagen und polymorphkernige Leukozyten zurückzuführen sein könnte, bei deren Zerfall hohe Proteinaseaktivitäten frei werden. Mit jeder neuerlichen Lungenaffektion nähme sodann die Zerstörung des Lungengewebes zu.

Die Kombination von α_1-Antitrypsin-Mangel und Leberzirrhosen liegt möglicherweise an einem Sekretionsdefekt der Leberzellen, die das atypische α_1-Antitrypsin[66] nicht aus der Zelle hinausbefördern können, und es somit zu einer Kumulation des Defekt-α_1-Antitrypsins in den Leberzellen kommt. Dies könnte wiederum zu einer Zirrhose führen[14,26,1]. Diese Unfähigkeit zur Sekretion liegt wahrscheinlich an einem Neuraminsäuretransferase-Defekt, der verhindert, daß die terminalen Neuraminsäuren an das α_1-Antitrypsin angehängt werden können[7]. Häufig werden bei der Kombination α_1-Antitrypsin-Mangel mit Leberzirrhose auch Hepatome beobachtet[13].

Der häufig bei chronischen unspezifischen Lungenerkrankungen mit Emphysem beobachtete α_1-Antitrypsin-Anstieg beruht wohl auf der bei Entzündungen wechselnder Genese auftretenden α_1-Antitrypsin-Titererhöhung. Vor der Erkrankung lag in diesen Fällen ein normal hoher Protein-Inhibitor-Spiegel im Serum vor[46]. Diese Titererhöhung ist die weitaus am häufigsten auftretende Veränderung bei Lungenerkrankungen. Der von Laurell und Eriksson[45] beschriebene α_1-Antitrypsin-Mangel ist dagegen sehr selten.

Erhöhungen des α_1-Antitrypsin-Serumspiegels[41] werden regelmäßig bei unspezifischen Entzündungen aller Art, malignen metastasierenden Tumoren, Verbrauchskoagulopathien[20] sowie bei Myokardinfarkten, nekrotesierender Pankreatitis, Niereninfarkten und Verschlußikteren[3] gefunden.

Weiterhin steigern Erhöhungen im Östrogengehalt, ob sie nun physiologischer oder therapeutischer Ursache sind, die im Serum gefundene Menge des α_1-Antitrypsins. Man findet erhöhte Werte bei Schwangerschaft[16,24], wie auch nach Östrogeneinnahme[51].

Der auslösende Mechanismus wie auch der biologische "Zweck" dieser α_1-Antitrypsin-Erhöhung sind jedoch nicht ausreichend erforscht.

1. α_1-Antitrypsin - Stellung im Gerinnungssystem

Da es während der Schwangerschaft zu einer Steigerung der Koagulabilität des Blutes kommt, die durch die Vermehrung einiger Gerinnungsfaktoren[60] sowie durch deren Aktivitätssteigerung hervorgerufen wird, ist es insbesondere während der Zeit der Gravidität interessant, den Verlauf des wichtigsten Proteinase-Inhibitors, des α_1-Antitrypsins, zu kennen, um womöglich drohende Komplikationen vorher zu erfassen, da schwere lokale und allgemeine Blutgerinnungsstörungen auch heute noch zu den gefürchtetsten Komplikationen in der Geburtshilfe gehören[39].

Völlig geklärt sind die vielfältigen Wechselbeziehungen der einzelnen Proteinase-Inhibitoren auf das Gerinnungssystem noch nicht; eine gute Übersicht gaben jedoch N. Heimburg et al.[31] in der untenstehenden Skizze:

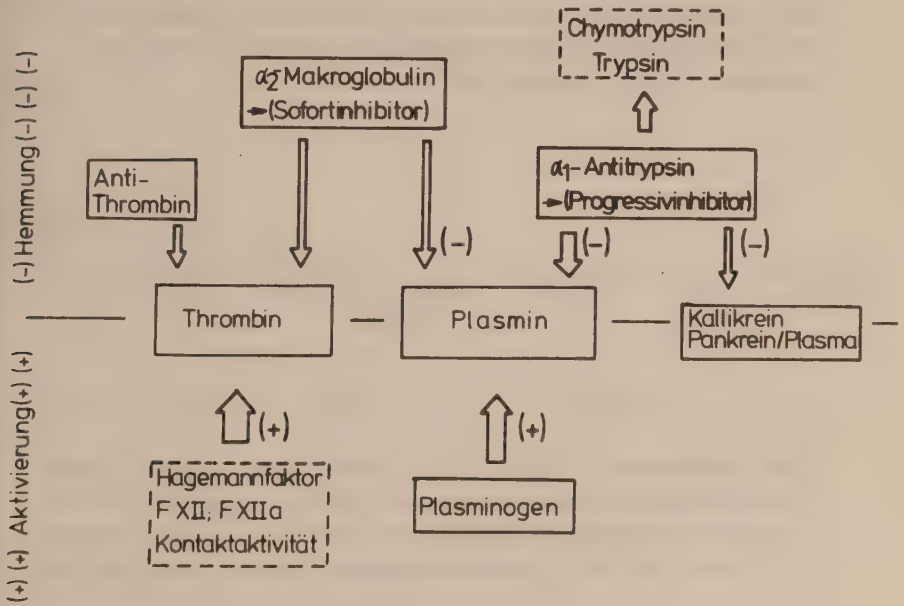


Abb. 1: Stellung des α_1-Antitrypsins im Gerinnungssystem (nach Heimburg et al.)

Die bekannte, der Hyperkoagulabilität des Blutes in der Gravidität entgegenlaufende Verminderung der fibrinolytischen Aktivitäten deutet auf eine Vermehrung der Protease-Inhibitoren hin, die damit die Konzentration des Plasmins im Blut vermindern (vgl. Abb. 1). So erfahren z.B. eine Reihe der an der Blutgerinnung beteiligten Faktoren im Verlaufe der Schwangerschaft eine Erhöhung um ungefähr 30 %, i.e.:

Faktor VII (Proconvertin)
Faktor X (Stuart-Prower-Faktor)
Faktor XIII (Antihämophiles Globulin).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob und wie sich die Trypsin-inhibierende Kapazität (TIC) (vgl. Definition der Inhibitoreneinheiten, S. 20) im Verlaufe der Gravidität verändert.

Die TIC wurde den Methoden, die das α_1-Antitrypsin durch immunologische Bestimmung messen, vorgezogen, da hierbei der tatsächliche, physiologischerweise vorkommende Effekt, einschließlich der schützenden und hemmenden Einflüsse, erfaßt wird (vgl. Seite 18).

V. α_1-Antitrypsin im Verlauf der Gravidität

In einer 1975 erschienenen Arbeit von J.O. Morse et al.[53] wurde bei 2.586 Personen mit einem Lebensalter von über fünf Jahren die Trypsin-inhibierende Kapazität (TIC) des Serums untersucht. Dabei lag das Maximum bei 1,5 mg/ml TIC. Es zeigte sich eine lediglich geringe Altersabhängigkeit (Abb. 2).

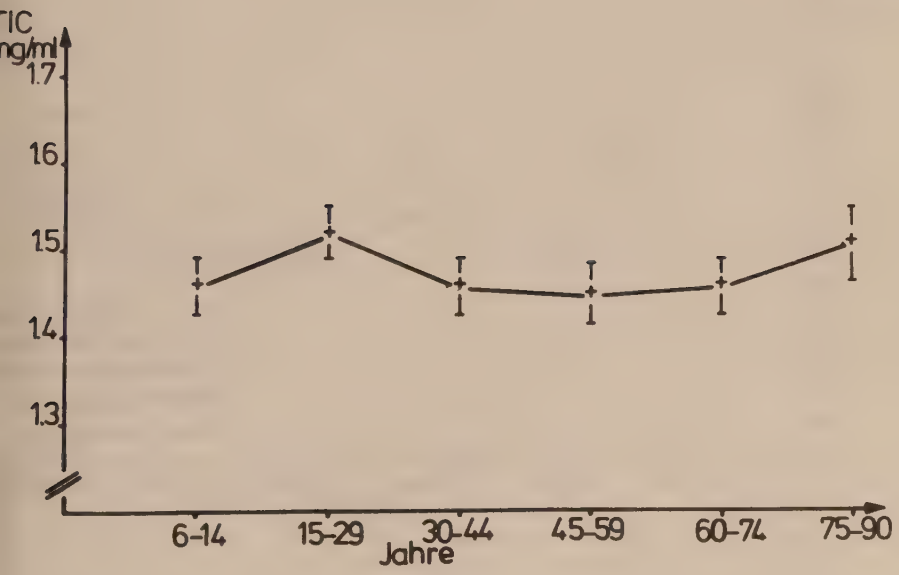


Abb. 2: Altersabhängigkeit des TIC-Serumspiegels

Dabei fiel ein deutlicher Gipfel in der Altersgruppe von 15 - 29 Jahren auf. Als die weibliche Personengruppe getrennt untersucht wurde und von der so erhaltenen Kurve die Werte der Frauen abgezogen wurden, die an akuten Er-

krankungen litten, Östrogene einnahmen oder gravide waren, zeigte sich nur eine geringe Steigerung des α_1-Antitrypsin-Spiegels mit zunehmendem Alter (Abb. 3). Der Gipfel in der Altersgruppe von 15 - 29 Jahren wie auch die erhaltenen Werte in der Gruppe von 30 - 44 Jahren war nicht mehr festzustellen.

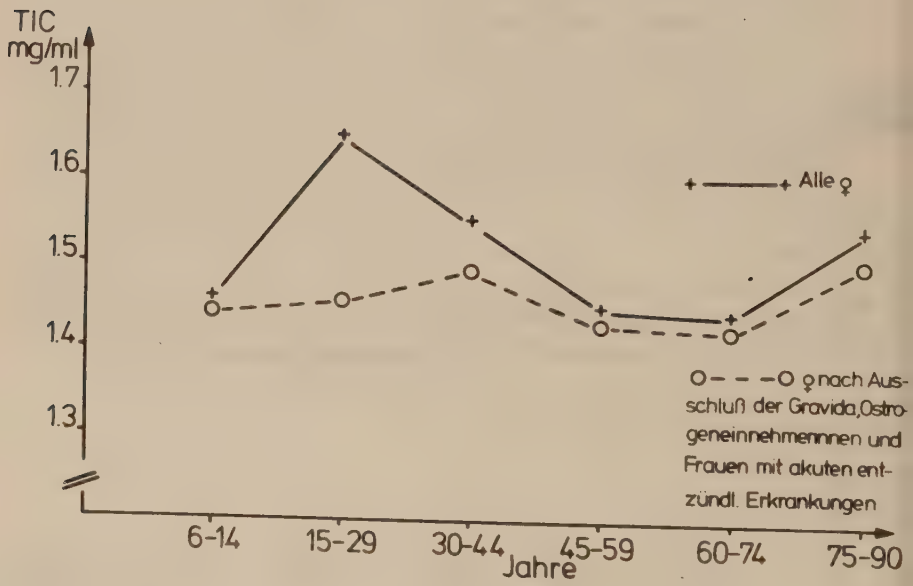


Abb. 3: Korrigierte Altersabhängigkeit des TIC-Serumspiegels

In diesen Altersgruppen werden vermehrt östrogenhaltige Antikonzeptiva eingenommen und gleichzeitig sind die Schwangerschaften in der Gruppe der Frauen von 15 - 44 Jahren naturgemäß häufiger als in den Vergleichsgruppen.

Östrogengehalt wie auch Schwangerschaft haben einen steigernden Effekt auf die Trypsin-inhibierende Kapazität des Serums (TIC). (Vgl. Kapitel: Eigene Untersuchungen und Methodik)

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, wie sich die TIC im Verlauf der Schwangerschaft ändert.

VI. Trypsinbestimmung mit BAPNA

Zur einfachen colorimetrischen Messung des in der Probe vorhandenen Trypsins wird ein schon 1960 von Haverback[27] und später von Erlanger[15] synthetisiertes künstliches Substrat verwendet, das N-α-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid, abgekürzt BAPNA.

Nagel et al.[55] haben 1965 ein Verfahren angegeben, welches die Spezifität des Trypsins mit diesem synthetischen Substrat, dem N-α-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) ausnützt. Genauere Untersuchungen über das Verhalten von BAPNA als Indikator zur Bestimmung des Trypsins wurden von Bieth [6] und Méthais [52] (1966) durchgeführt.

Das hier verwendete Verfahren beruht im wesentlichen auf der von Bieth et al. [4] 1968 angegebenen Methode.

Im Gegensatz zu den Estersubstraten (z.B. N-α-Benzoyl-arginin-äthylester und L-Tyrosinäthylester, Nitrophenylester), die häufig nicht ausreichend beständig sind[55, 5], besitzt das BAPNA, das zur Trypsinbestimmung in Dimethylformamid gelöst wird, sowohl in kristalliner als auch in gelöster Form eine sehr gute Beständigkeit. Ebenfalls ist die Spezifität für Trypsin sehr groß.

Das künstliche Substrat BAPNA eignet sich also durch seine Spezifität hervorragend zur Trypsinbestimmung. Plasmin, Thrombin sowie Chymotrypsin spalten zwar BAPNA ebenfalls in der nachfolgend beschriebenen Weise, jedoch wesentlich langsamer, so daß diese Zerlegung in der im Verfahren erforderlichen Inkubationszeit vernachlässigt werden kann[55,6,2

Nach Bieth et al. [6] sind die Aktivitäten pro mg α_1-chymotrypsin bei $35 \cdot 10^{-3}$, bei Plasmin $1 \cdot 10^{-3}$ und bei Thrombin $4 \cdot 10^{-5}$, die von Trypsin dagegen jedoch 1,9 !

Unter dem Einfluß des Trypsins wird das nahezu farblose N-α-Benzoyl-arginin-p-nitroanilid in N-α-Benzoyl-arginin und p-nitroanilin gespalten, wobei letzteres eine intensive gelbe Farbe aufweist. Die Freisetzung des p-nitroanilins wird bei 405 nm in einem Eppendorf-Extinktiometer nachgewiesen. Sie wird in nachstehender Formel erklärt. Es handelt sich bei der Umwandlung des BAPNA in p-nitroanilin unter Einwirkung des Trypsins um eine hydrolytische Spaltung.

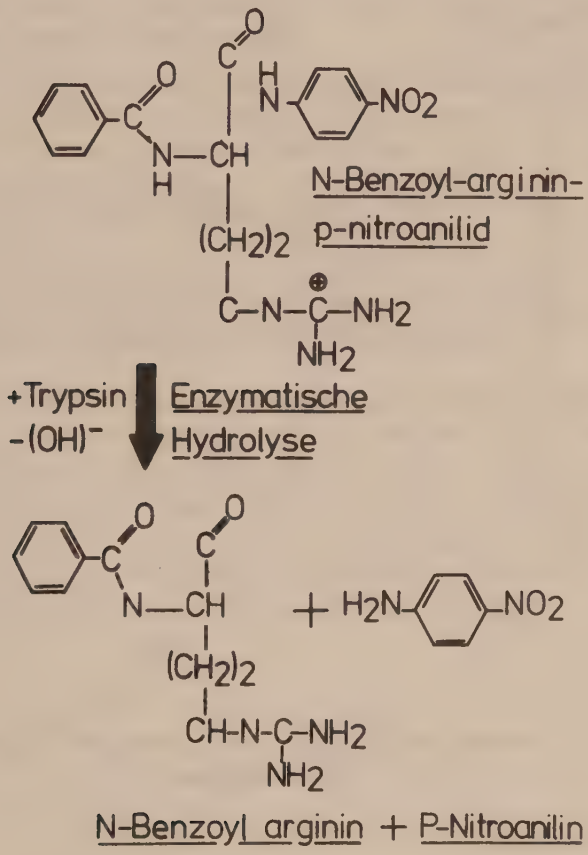


Abb. 4: Enzymatische Hydrolyse des BAPNA durch Trypsin in N-Benzoyl-arginin und Paranitroanilin

Die Freisetzung des p-nitroanilins wird mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen.

Abb. 5 zeigt die Absorptionsspektren von p-nitroanilin und dem verwendeten N-α-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid bei Wellenlängen zwischen 370 nm und 500 nm.

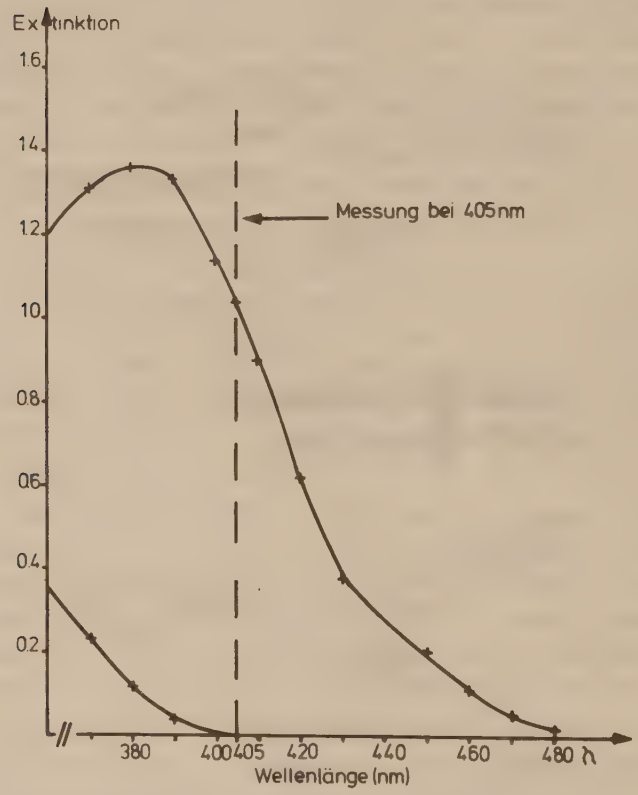


Abb. 5: Vergleichende Absorptionsspektren von p-nitroanilid und BAPNA

Hier zeigt sich, daß bei der verwendeten Wellenlänge von 405 nm, die abweichend von den von Bieth angegebenen 420 nm des Originalverfahrens bevorzugt wurde, eine minimale Absorption für BAPNA, jedoch eine besonders große Absorption für p-nitroanilid vorhanden ist [55, 6].

Die von Bieth et al.[4] angegebene Methode wurde zuerst überprüft. Aus diesen Untersuchungen ergaben sich gegenüber der Bieth-Methode folgende Veränderungen: Als Wellenlänge wurden 405 nm anstelle von 420 nm (vgl. Abb 5) gewählt. Außerdem wurde das Ansatzvolumen erhöht.

Nach Nagel et al.[55] ist der molare Extinktionskoeffizient im Bereich von PH 0,8 $\pm$ 0,4 konstant und beträgt 9,9 x 10^3 ($1.Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Das Molekulargewicht von BAPNA ($C_{19}H_{23}ClN_6O_4$) beträgt 434,89.

Abhängigkeit der p-nitroanilin-Bildung von der Trypsin-Konzentration, der Inkubationszeit und -temperatur

Zwischen der Trypsinkonzentration und der Extinktion, die das freigesetzte p-nitroanilin anzeigt, besteht eine lineare Beziehung (Abb. 6). Bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten, einer Inkubationstemperatur von 37°C und einer Wellenlänge von 405 nm gilt dies für Trypsin-Konzentrationen bis zu mindestens 60 µg/Ansatz. Genauere Versuchsbedingungen sind im methodischen Teil der Arbeit beschrieben.

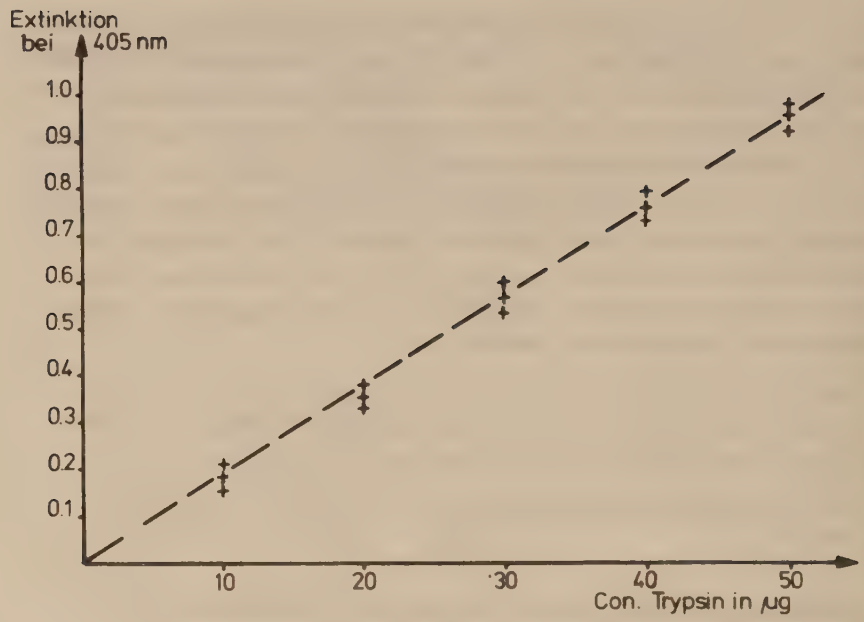


Abb. 6: Eichkurve

Bieth et al. [6] geben die Michaelis-Konstante der Reaktion des Trypsins mit BAPNA bei vergleichbaren Bedingungen mit $0{,}99 \times 10^{-3}$ an.

Zeitabhängigkeit

Abb. 7 zeigt die Extinktion in Abhängigkeit zu der Inkubationstemperatur.
Es wurden von einem Eppendorf-Schreiber kontinuierlich die Extinktion gegen die Zeit t in Minuten aufgetragen. Eingesetzt wurden 0,4 µg Trypsin und 0,003 M BAPNA, jedoch wurde keine Essigsäure und kein Serum zugesetzt.

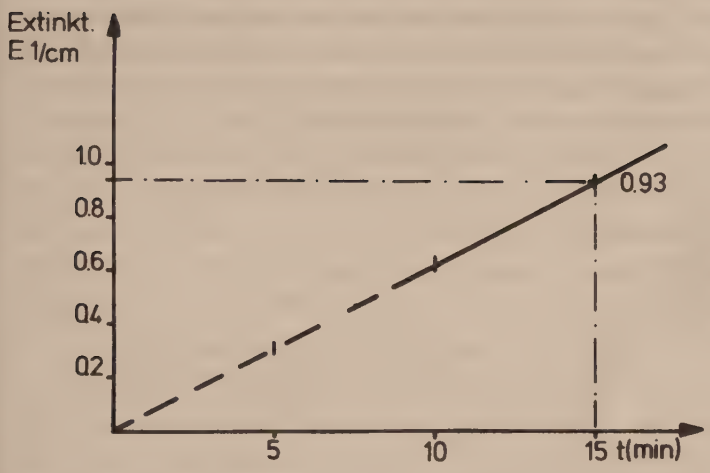


Abb. 7: Zeitabhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse des BAPNA unter Einfluß von 40 µg Trypsin/Ansatz, kontinuierlich gemessen im Eppendorf-Extinktiometer mit temperierter Cuvette (37°C) und Eppendorf-Schreiber.

VII. Weitere Einflüsse des Humanserums auf tryptische und antitryptische Aktivitäten

Bei den Vorversuchen zur Bestimmung der Trypsin-hemmenden Aktivitäten zeigte sich, daß die hydrolytische Aktivität des reinen Trypsinansatzes ohne Serum stets niedriger als erwartet war, d.h. unterhalb des extrapolierten Schnittpunktes (S) der Geraden durch die drei Punkte der Serumzugaben von 4 µl, 8 µl und 12 µl und der Senkrechten durch den O ml-Serumpunkt lag.

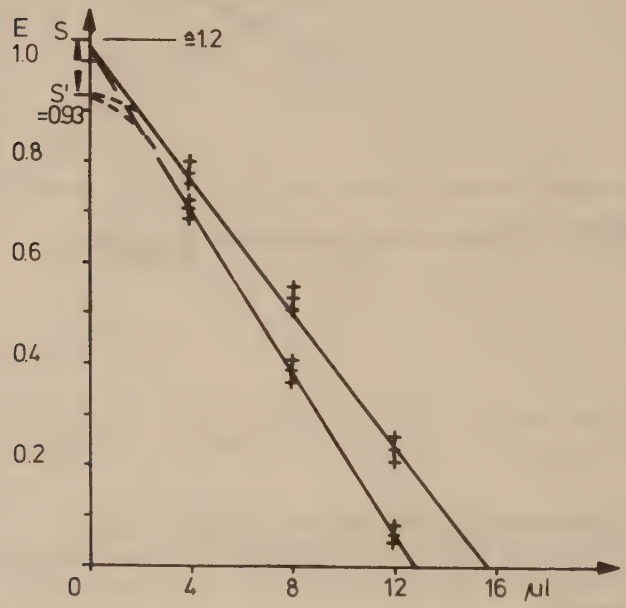


Abb. 8.: Antitryptische Aktivitäten im Humanserum. Zu konstanten Mengen Trypsin (40 µg/Ansatz) werden 0 µl, 4 µl, 8 µl und 12 µl Serum zugefügt.

Diese Beobachtung stimmt mit den Untersuchungen von Bieth et al.[4] und K. James et al.[36] überein, da diese geringe tryptische Aktivität ohne die Zugabe von Serum als Aktivierung durch das Serum gedeutet werden könnte.

Bieth und James haben diese Aktivitätssteigerung weiter untersucht und kamen zu dem Ergebnis, daß es im Humanserum durch Serumproteine zu einer Aktivierung der tryptischen Aktivität kommt und zwar v o r der Hemmung des Trypsins. Die Aktivitätssteigerung lag bei ungefähr 9 %. Die aktivierenden Proteine sind nicht isoliert worden, der Mechanismus wurde ebenfalls noch nicht geklärt.

Es wurden jedoch weitere Einflüsse auf die antitryptischen Aktivitäten des Serums untersucht. Dabei wurden zwei Eigenschaften des Serums getrennt aufgezeigt:

1) Stöchiometrische Hemmung
2) Schutzphase für tryptische Aktivität.

In der ersten Phase nach Zugabe ansteigender Mengen von Serum zu einer konstanten Menge Trypsin sank die tryptische Aktivität linear ab, d.h. TIC nahm zu. (In diesem Bereich wurden die Messungen zur Bestimmung des α_1-Antitrypsins im Serum bei Schwangeren durchgeführt.) Wird jedoch immer mehr Serum zugefügt, so nimmt die TIC wieder ab, da α_2-Makroglobulin als Inhibitor eine größere Affinität hat als die anderen Trypsin-Inhibitoren und der Trypsin-α_1-Antitrypsin-Komplex wieder dissoziiert, die Aktivität des an α_2-Makroglobulin gebundenen Trypsins jedoch n i c h t durch das α_1-Antitrypsin gehemmt werden kann.

VIII. α_1- Antitrypsin-Bestimmung mit der oben beschriebenen Methode

Definition der Inhibitoreinheit

IU

In Anlehnung an die Internationale Enzymeinheit (U) wird die Inhibitoreinheit mit IU bezeichnet. Eine IU wird diejenige Menge Inhibitor genannt, welche eine Enzymeinheit (U) unter definierten Bedingungen hemmt.
Bei einer Hemmung von 50 % reduziert eine Inhibitoreinheit die enzymatische Aktivität von zwei Enzymeinheiten, dadurch wird der Substratumsatz um 1 µMol/min reduziert (1 IU)[3].

TIC

Abweichend von der Inhibitoreinheit IU wird noch eine von P. Méthais[52] und Bieth et al.[4] angegebene Trypsin-Inhibitionskapazität TIC = Trypsin-inhibiting-capacity (= CIT = capacité d'inhibition trypsique) häufig verwendet.
TIC wird in Trypsineinheiten ausgedrückt, die durch 1 ml Serum gehemmt werden (UTI/ml = Units of Trypsin Inhibited)[4,52]

Die von Nagel et al.[55] angegebene Methode zur Bestimmung von Trypsin mittels des synthetischen Substrats N-α-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid (BAPNA) eignet sich sehr gut zur indirekten Messung des α_1-Antitrypsin-Gehaltes im Serum.

Fügt man einer Serumprobe konstante Mengen Trypsin hinzu, so wird das im Serum vorhandene α_1-Antitrypsin eine bestimmte Menge des Trypsins inaktivieren. Das restliche Trypsin spaltet dann das hinzugefügte BAPNA (Reaktionsgleichung s. Kapitel: Trypsinbestimmung mit BAPNA) zu p-nitroanilin. Da BAPNA ein anderes Absorptionsmaximum des Lichtes bei 405 nm als p-nitroanilin aufweist, kann man die entstandene Menge p-nitroanilin im Photometer messen.

Die erhaltene p-nitroanilin-Menge im Ansatz wird bei gleicher Trypsinkonzentration und Substratkonzentration umgekehrt proportional zu der im Serum vorhandenen α_1-Antitrypsin-Menge sein, denn je mehr α_1-Antitrypsin im Serum vorhanden ist, desto weniger bleibt aktives Trypsin übrig, desto geringer ist die p-nitroanilin-Bildung aus BAPNA.

$$\alpha_1\text{-Antitrypsin} \sim \frac{1}{\text{p-nitroanilin}} \qquad (1)$$

Ein Mol des durch Hydrolyse entstandenen p-nitroanilins entspricht einem Mol Trypsin, das ein Mol BAPNA gespalten hat. Bei einer Hemmung von 50 % entspricht dies einem Mol Inhibitor (α_1-Antitrypsin) im Serum[4,6].
Folglich ist die konstante, der Serumprobe zugegebene Menge Trypsin minus der gehemmten Trypsinmenge dem α_1-Antitrypsin im Serum proportional.

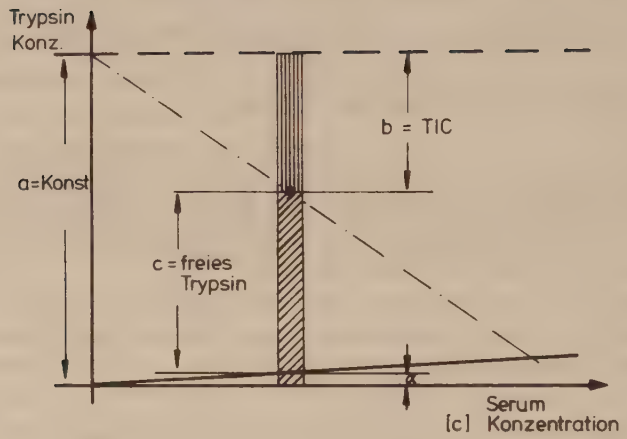
$$\text{TRY}_{(\text{konst.})} - \text{TRY}_{(\text{inhib.})} \sim \alpha_1\text{-Antitrypsin} \qquad (2)$$

$$\Delta\ \text{TRY} \sim \alpha_1\text{-Antitrypsin} \qquad (3)$$

$$\Delta\ \text{TRY} \times f^* = \alpha_1\text{-Antitrypsin} \qquad (4)$$

*Im mathematischen Teil wird der Proportionalitätsfaktor f bestimmt. Sein Wert beträgt bei der nachfolgend dargestellten Versuchsanordnung

$$= 0{,}00938 - 10^3 \qquad (5)$$



a=Gesamtmenge des konstant zugesetzten Trypsins (40 µg/Ansatz)

b=TIC ≙ vom Serum gehemmtes Trypsin (davon 90% durch α_1-Antitrypsin)

c=Restaktivität (= freies Trypsin, welches zur hydrolytischen Spaltung des BAPNA benutzt wird.)

d=Trypsin welches an α_2-Makroglobulin gebunden wurde (sehr geringer Anteil)

Abb. 9

Damit die antitryptischen Aktivitäten im Serum mit dieser Methode bestimmt werden können, d.h. ein stabiler TRY-Inhibitor-Komplex entsteht, muß die Affinität des Enzyms zu dem Inhibitor größer sein als die Affinität des Enzyms zum

Substrat. Es muß also die Dissoziationskonstante K_m von BAPNA und Trypsin größer sein als die Inhibitionskonstante K_i von Trypsin und α_1-Antitrypsin. K_m BAPNA/TRY beträgt $0.99 \cdot 10^{-3}$ bei einem PH-Wert von 8,0[6].

Die K_i beträgt $0.84 \cdot 10^{-7}$ (M)[4].

Somit ist gewährleistet, daß das Trypsin eine höhere Affinität zu dem Serum-Inhibitor hat als zum Substrat BAPNA. Die Hemmung tritt spätestens nach 20 sec ein[55], so daß die Vorinkubationszeit, die in der hier verwendeten Methode vorgesehen ist, völlig ausreicht. Durch die niedrige K_i wird diese schnelle Hemmung gut erklärt. Prinzipiell kommen drei Arten der Hemmung vor und zwar die

1) kompetitive
b) nicht kompetitive
3) unkompetitive,

wobei die unkompetitive Hemmung bei Enzymreaktionen relativ selten auftritt.

Bieth et al.[6] fanden, daß es sich bei der TRY-α_1-Antitrypsin-Hemmung mit großer Sicherheit um eine nicht kompetitive Hemmung handelt.

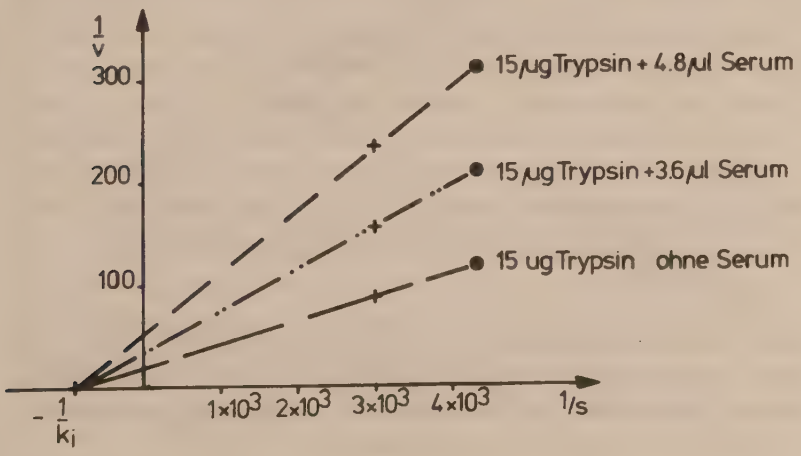


Abb. 10: Darstellung der Hydrolyse durch Trypsin nach Lineweaver and Burke

Im Gegensatz zu der kompetitiven Hemmung, bei der Hemmstoff und Substrat ähnliche Bindungsstrukturen aufweisen und an der gleichen Bindungsstelle des Enzyms angelagert sind, scheinen Hemmstoff und Substrat bei der nicht kompetitiven Hemmung nicht an der gleichen Stelle des Trypsinmoleküls gebunden zu werden.

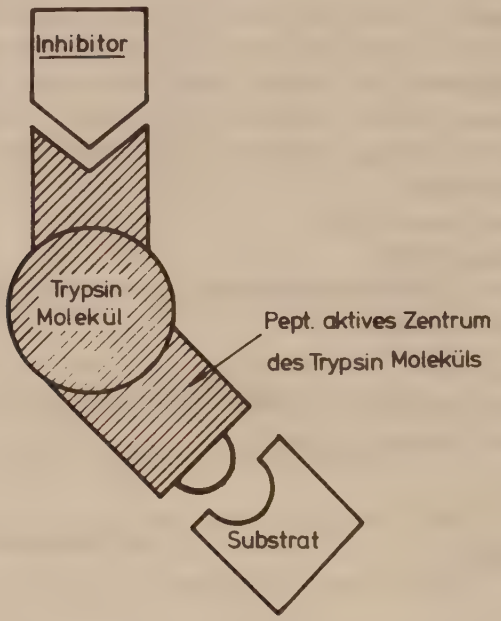


Abb. 11: Schematische Darstellung der verschiedenen "Rezeptoren" für die Inhibitoranlagerung des peptisch aktiven Zentrums an einem Trypsinmolekül

Außerdem ist erforderlich, daß keine tryptischen Aktivitäten im Humanserum vorhanden sind. Es wurde von mehreren Autoren untersucht und gefunden, daß physiologischerweise kein Trypsin im Humanserum nachweisbar ist[54, 27].

Während der Gravidität erfolgt eine Abnahme der fibrinolytischen Aktivitäten, die sich theoretisch sowohl auf eine Verminderung der Aktivatoren als auch auf eine Zunahme der Inhibitoren der Fibrinolyse zurückführen liesse, sofern der Inhibitorengehalt im Serum ansteigt.

Eigene Untersuchungen und Methodik

Verschiedene Untersucher fanden heraus, daß am Ende der Gravidität, verglichen mit nichtgraviden Frauen, die keine Ovulationshemmer einnahmen, eine ungefähr doppelt so hohe Konzentration von α_1-Antitrypsin im Serum vorhanden war[10]. Der genaue Mechanismus, der die Erhöhung der α_1-Antitrypsin-Konzentration auslöst, konnte bisher nicht entdeckt werden.

Bei Ganrot und Bjerre[24] wurde das α_1-Antitrypsin in Anlehnung an Faarvang als stress- und glukokortikoidregulierter Trypsininhibitor benannt. Die oben genannte Untersuchung von Ganrot und Bjerre ergab einen Anstieg des α_1-Antitrypsin-Mittelwertes um 208 % des Ausgangswertes.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun der genaue Verlauf der tryptischen Aktivitäten bei der physiologischen Temperatur von 37°C ermittelt werden. Eine weitere Zielsetzung war, nach Möglichkeit eine Normalwertkurve zu finden, die es erlauben würde, gestörte Graviditäten frühzeitig zu erkennen.

Die Kollektive wurden in einzelne Schwangerschaftswochen unterteilt. Damit sollte im Gegensatz zu den in Monaten zusammengefaßten Kollektiven von Bjerre ein möglichst genauer Kurvenverlauf erreicht werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde das Verhalten der α_1-Antitrypsin-Konzentration im Humanserum im Verlauf der Gravidität bestimmt. Es wurden 240 verschiedene Seren von Graviden ab der vierten bis zur 40. Schwangerschaftswoche untersucht. Venenblut wurde zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bis zur Bearbeitung bei -24°C aufbewahrt.

Das Blut wurde nur dann verwendet, wenn die Gravidität entweder klinisch einwandfrei geklärt oder in der Frühschwangerschaft durch HCG-Bestimmungen (Pregnosticon^R) erwiesen war. Die Blutentnahme erfolgte nach klinischer Untersuchung, so daß pathologische Schwangerschaften weitgehend ausgeschlossen werden konnten.

Bestimmung der Serumproben:

Reagentien:

Enzym: Kristallines Trypsin (Fa. Merck, Darmstadt)
Aktivität: 2,0 U/mg für biochemische Zwecke

Substrat: N-α-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid ($C_{19}H_{23}ClN_6O_4$) der Fa. Merck mit einem Molekulargewicht von 434,89

Lösungsmittel: HCl 10^{-3} M, Dimethylformamid und NaCl 0,15 M

Sonstiges: $CaCl_2$, Essigsäure 30 %

Trypsin-Stammlösung (Lösung 1): Sie enthält 100 µg/ml Trypsin, gelöst in 10^{-3} M HCl. Zur Aktivitätserhöhung wird noch $CaCl_2$ 0,25 M hinzugegeben. Dadurch steigert sich die Trypsin-Aktivität um 3 - 4 % gegenüber einem Ca-freien Puffer. Diese Lösung ist im Kühlschrank ca. 10 Tage haltbar (Verhinderung von Pseudotrypsin).

BAPNA-Stammlösung (Lösung 2): Da sich das N-α-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid, das als Substrat für das Trypsin verwendet wird, sehr schlecht löst, muß

es in Dimethylformamid bei 40°C während 12 Stunden im Wasserbad gelöst werden. Die Stammlösung soll 0,4 M sein. Sie wird mit unten stehendem Trihydroximethylaminomethan- (Tris-) Puffer gepuffert.
Die Lösung 2 muß dann kurz vor jedem Versuch auf 0,003 M BAPNA mit Tris-Puffer (Lösung 3) verdünnt werden. Diese Lösung hält sich im Kühlschrank bei 4°C unter Lichtabschluß mindestens 8 Wochen, bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß ungefähr 14 Tage.

Tris-Puffer (Lösung 3): Trihydroximethylaminomethan in einer Konzentration von 0,05 M. Der Puffer wird mit HCl auf einen PH-Wert von 0,8 $\pm$ 0,1 eingestellt. Er enthält $CaCl_2$ mit einer Konzentration von 0,054 M.

Bestimmung der Trypsin-Inhibitor-Kapazität (TIC)

Methodik:

Nach Bieth et al.[4], modifiziert. Alle Reagentien wurden auf 25°C vorgewärmt.

Jede Messung wurde als Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

1. Die zu messenden Serumproben werden mit physiologischer Kochsalzlösung (0,15 M) im Verhältnis 1 : 25 verdünnt.

2. 0,3 ml des im Verhältnis 1 : 25 verdünnten Serums werden mit NaCl (0,15 M) auf 1,1 ml aufgefüllt.

2.1 Als Leerwert und als Kontrolle laufen noch Proben mit, die 0,0, 0,1 und 0,2 ml Serum enthalten.

3. Zu den 1,1 ml-Proben werden nun konstant 0,4 ml der Trypsin-Stammlösung (Lösung 1) hinzugegeben (entspricht 40µg/ml Trypsin pro Ansatz).

3.1 Dieser 40 µg Trypsin enthaltende Ansatz wird nun 3 Minuten lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

4. Danach werden 0,2 ml NaCl (0,15 M) hinzugegeben.

5. Währenddessen wird die BAPNA-Stammlösung (Lösung 2) auf 0,003 M mit dem Tris-Puffer (Lösung 3) verdünnt (= Lösung 4).

6. Nach der dreiminütigen Inkubation wird aus jedem Gläschen 1 ml herauspipettiert und nach Umrühren mit 2 ml der Lösung 4 zur Reaktion gebracht.

7. Dieser 3-ml-Ansatz wird 15 Minuten bei 37°C inkubiert (enzymatische Hydrolyse des BAPNA).

8. Die Reaktion wird mit 1 ml 30%iger Essigsäure gestoppt.

Vorsicht: Dem Leerwert wurden die 0,4 ml Trypsin erst n a c h dem Reaktionsstopp durch die 30%ige Essigsäure hinzugefügt.

Nach 15 Minuten wird die Extinktion in einem Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm in einer 1 cm-Cuvette gemessen.

Störmöglichkeiten: Reste von Spülmittel und andere Verunreinigungen der Gläschen führten zum Ausfällen des BAPNA (Kristallisationskeime).

IX. Berechnung der trypsinhemmenden Kapazität nach Trautschold

Aus der Definition der Inhibitoreinheit (S. 20) und unter Berücksichtigung der äquimolaren Hemmung läßt sich im vorliegenden Fall die Bestimmung des α_1-Antitrypsins auf eine Messung der Restaktivität des zugesetzten nicht inhibierten Trypsins zurückführen.

Diese Bestimmung des nicht gehemmten Trypsins erfolgt wie oben im einzelnen ausgeführt mittels des künstlichen Substrats BAPNA über die Photometrie des aus dem BAPNA durch Trypsin freigesetzten PNA.

1 mU Trypsin erzeugt nach H. Fritz et al.[21] im 1 ml-Ansatz eine Extinktionsänderung von 0,00995/min (Extinktionskoeffizient für PNA = $9{,}95 \cdot 10^3$ x $1.Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$). (1

Die Menge des α_1-Antitrypsins läßt sich berechnen aus der Extinktionsdifferenz zwischen dem serumfreien Leerwert und der durch Serum inhibierten Probe.

$$E_{Try(Leerwert)} - E_{\substack{freies\ Try \\ nach\ Serum- \\ zusatz}} \approx \Delta E_{inhibiertes\ Try} \qquad (2$$

Im vorliegenden Fall wird jedoch ein 4 ml-Ansatz 15 Minuten inkubiert, so daß die Extinktionsänderung pro Minute im 1 ml-Ansatz das $\frac{4}{15}$ -fache beträgt. Zusammen mit (1) folgt für unsere experimentellen Bedingungen:

$$1\ mU\ inhibiertes\ Trypsin = \frac{(E_{Try} - E_{freies\ Try}) \frac{4}{15}}{0{,}00995} \qquad (3$$

Um den Gehalt des Trypsin-Inhibitors in 1 ml Patientenserum zu erhalten, ist die Gleichung (3) mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren zu multiplizieren:

$$1\ mU_{(Try\ inhib)} = \frac{(E_{Try} - E_{freies\ Try})\frac{4}{15} \cdot 25 \cdot 3{,}5}{0{,}00995 \cdot 0{,}3}$$

$$1\ mU_{(Try\ inhib)} = (E_{Try} - E_{freies\ Try}) \cdot 7816{,}862$$

Der Umrechnungsfaktor beträgt also 7,82. Sollen die Werte auf IU umgerechnet werden, so ist zusätzlich zu berücksichtigen, daß mit einer Inkubationstemperatur von 37°C gearbeitet wurde, d.h. die bei der obigen Rechnung erhaltenen Werte sind durch den Temperaturausgleichsfaktor 1,64 zu dividieren. Damit kommt man auf die auf 25°C festgelegten IU.

In dieser Arbeit wurde darauf verzichtet, die Antitrypsin-Bestimmung bei 25°C durchzuführen, da die gewählte Temperatur von 37°C als physiologischer angesehen wurde und sich damit sicher geringere "invitro-Effekte" bei der Antitrypsin-Trypsin-Komplexbildung ergeben. Außerdem werden die Bestimmungen durch die höhere Temperatur vereinfacht, wenn die Labor-Raumtemperatur die 25°C-Grenze übersteigt.

Die Ergebnisse wurden in einer Tabelle (S. 33) sowie in den Schaubildern Abb. 12 und Abb. 13 zusammengefaßt.

X. Ergebnisse

Abb. 12 zeigt, daß das α_1-Antitrypsin von Beginn der Gravidität bis zur 40. Schwangerschaftswoche auf ungefähr das Doppelte des Ausgangswertes ansteigt. Der Anstieg des Mittelwertes, ausgehend von dem nichtgraviden Kollektiv zum Kollektiv der 40. Woche, beträgt das 2,063-fache.

Die in Abb. 12 berechnete Regressionskurve ist eine Parabel

$$y = A + Bx + Cx^2,$$

wobei A = 2,95, B = 0,14 und C = 0,0015 ist. Bei den 240 Werten beträgt der Regressionskoeffizient R^2 = 0,63 für diese Parabel. Die Berechnung wurde mit dem "Familiy Regression Program" der Firma Hewlett-Packard durchgeführt.

Die nachfolgende Tabelle (Abb. 13) gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen in der 0. bis 40. Woche an, wobei die Wochen eins, zwei, drei, fünf und 35 fehlen, da hier keine ausreichende Anzahl von Patientenseren gesammelt werden konnte.

Nach Bergmeyer[3] entspricht 1 IU gleich 2,1 TIC.

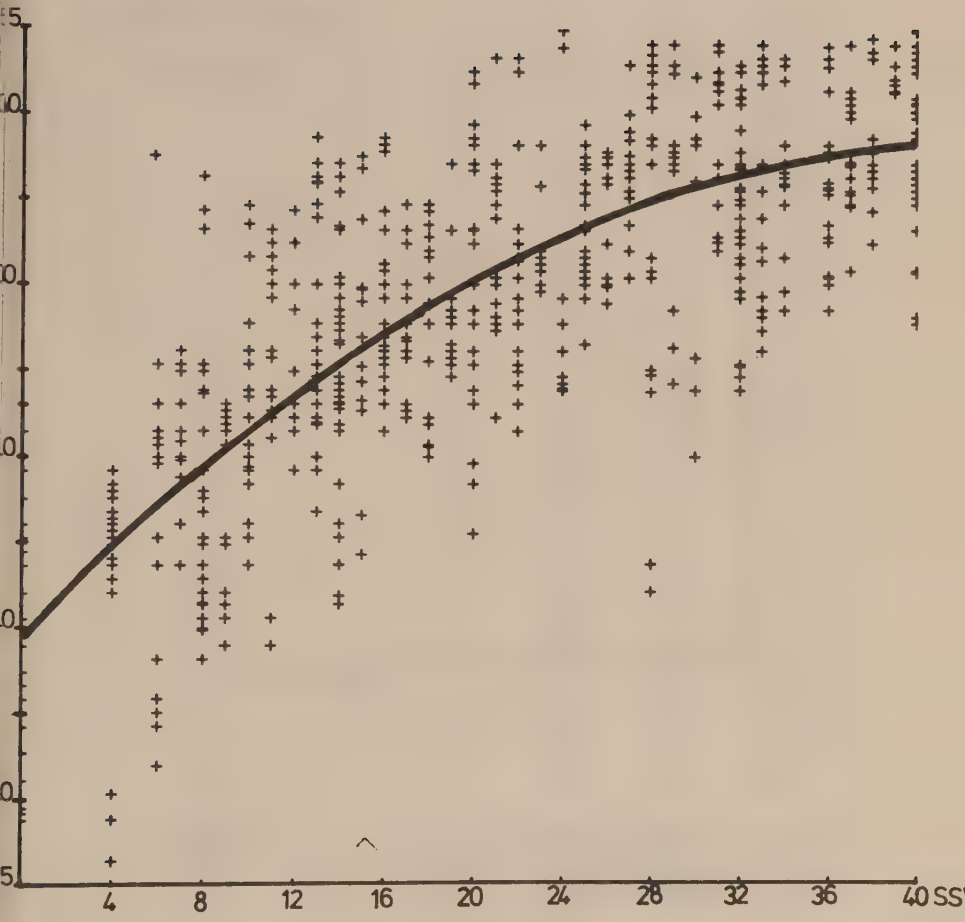


Abb. 12

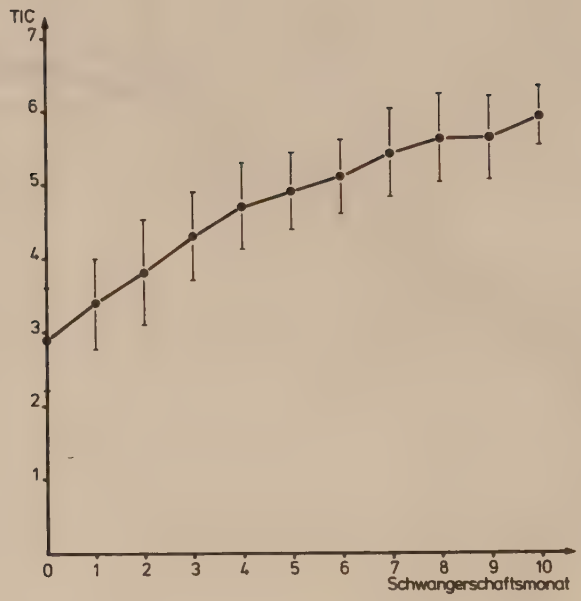


Abb. 13: Anstieg des α_1-Antitrypsins mit Standardabweichungen (Einzelwerte in Monaten zusammengefaßt)

Schwangerschaftswoche	n	$\bar{x}$	s_x	$s_{\bar{x}}$
Nichtgravide	38	2,87	0,70	0,11
4	22	3,38	0,65	0,14
5	0			
6	17	3,46	0,79	0,19
7	12	4,12	0,39	0,11
8	27	3,77	0,78	0,15
9	13	3,73	0,53	0,15
10	25	4,29	0,58	0,12
11	17	4,50	0,71	0,17
12	11	4,64	0,53	0,16
13	26	4,71	0,66	0,13
14	21	4,55	0,50	0,11
15	13	4,48	0,78	0,22
16	23	4,92	0,48	0,10
17	18	4,70	0,40	0,10
18	21	4,86	0,51	0,11
19	15	4,83	0,32	0,08
20	26	5,05	0,81	0,16
21	16	5,29	0,38	0,09
22	21	4,99	0,65	0,14
23	11	5,20	0,26	0,06
24	14	4,98	0,91	0,24
25	21	5,35	0,34	0,07
26	15	5,43	0,35	0,09
27	20	5,58	0,30	0,07
28	24	5,37	1,00	0,20
29	12	5,62	0,65	0,19
30	9	5,37	0,82	0,27
31	18	5,98	0,43	0,10
32	30	5,47	0,56	0,10
33	24	5,72	0,66	0,14
34	15	5,63	0,47	0,12
35	0			
36	18	5,55	0,47	0,11
37	20	5,77	0,31	0,09
38	15	5,80	0,34	0,09
39	12	6,22	0,10	0,03
40	43	5,87	0,45	0,07

Abb. 14: Werte des α_1-Antitrypsins, gemessen in TIC
(= Trypsin Inhibiting Capacity)
(n = Meßwerte von 240 Frauen, davon 227 Gravide)

XI. Diskussion

Übereinstimmend mit der Voruntersuchung von Ganrot und Bjerre[24] und zeitgleich durchgeführten Untersuchungen mit der radialen Immunodiffusion nach Mancini von Kunz et al.[40] zeigt sich, daß sich die α_1-Antitrypsin -Konzentration im Serum von Graviden in der 40. Schwangerschaftswoche auch unter Berücksichtigung möglichst physiologischer Bedingungen auf ungefähr das Doppelte des Ausgangswertes von Nichtgraviden erhöht, d.h. es erfolgt eine Erhöhung des fibrinolyse h e m m e n d e n Inhibitors und somit eine potentielle Verminderung der fibrinolytischen Aktivitäten in der Gravidität. Da sich gleichzeitig die Aktivatoren des Fibrinolysesystems vermehren, ist von der α_1-Antitrypsin-Konzentration keine proportionale Zunahme der Gerinnungsfähigkeit zu erwarten. Es ist jedoch immerhin eine Tendenz zu erhöhter Gerinnungsneigung zu beobachten[9].

Die angestrebte "Normalkurve" von α_1-Antitrypsin zum Zwecke einer Schwangerschaftskontrolle kann aufgrund der stark schwankenden individuellen Konzentration nicht mit der wünschenswerten Genauigkeit realisiert werden. Da individuelle Ausgangskurven erforderlich wären, eignet sich das Verfahren zumindest für den Routinegebrauch nicht. Zur Zeit scheinen die HPL-, Oxytocinase- und Oestriolwerte zur Überwachung der foeto-plazentaren Einheit praktikabler, obwohl auch deren Normalwertkurven mit großen Standardabweichungen behaftet sind.

Inwieweit sich die α_1-Antitrypsin-Bestimmungen zur Erkennung von gravierenden Gerinnungsstörungen bei Schwangeren eignen könnte, müssen weitere Untersuchungen erweisen.

II. Zusammenfassung

Im Serum von 240 normalen gesunden Schwangeren wurde die Aktivität von α_1-Antitrypsin im Verlauf der Gravidität bestimmt. Hierzu wurde eine enzymatische Methode verwendet, bei der das künstliche Substrat Benzoyl-Arginin-Hydrochlorid zur indirekten Messung von α_1-Antitrypsin verwendet wurde (modifizierte Methode nach Bieth et al.[4]). Dies ist eine Methode, die die physiologische Hemmung durch α_1-Antitrypsin mißt. Dabei zeigte sich, daß die antitryptische Aktivität TIC (UTI/ml = Units of Trypsin inhibited) bei Schwangeren auf das 2,063-fache des Ausgangswertes von gesunden Nichtschwangeren, die keine Ovulationshemmer einnehmen, anstieg. Die Ergebnisse bestätigen im wesentlichen die Beobachtungen von Bjerre et al.[24] und Duck et al.[10]. Sehr selten vorkommende genetisch bedingte α_1-Antitrypsin-Defekte spielen bei der Bestimmung keine Rolle.

LITERATURVERZEICHNIS

1 Babb, R.R., G.A. Lillington and R.L. Kempson:
Cirrhosis in an Adult with Emphysema and Alpha$_1$-Antitrypsin Deficiency.
Dig.Dis. 18, 803-807 (1973)

2 Berg, N.O. and S. Eriksson:
Liver Disease in Adults with Alpha$_1$-Anti-Trypsin Deficiency.
Engl.J.Med. 287, 1264-1267 (1972)

3 Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse.
2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1970)

4 Bieth, J., P. Métais and J. Warter:
Activation, Inhibition and Protection of Tryptic and α-Chymotryptic Activity by Normal Human Serum.
Clin.Chim.Acta 20, 69-80 (1968)

5 Bieth, J., P. Métais et J. Warter:
Dosage de la chymotrypsine par la succinyl-phenylalanine-P-nitroanilide et ses applications.
Ann.Biol.clin. 26, 143-158 (1968)

6 Bieth, J., P. Métais et J. Warter:
Dosage de la trypsine par la benzoylarginine P-nitroanilide.
Ann.Biol.clin. 24, 787-803 (1966)

7 Chan, S.K. and D.C. Rees:
Molecular Basis for the α_1-Protease Inhibitor Deficiency.
Nature 255, 240-241 (1975)

8 Cox, D.W.: Defect in Alpha$_1$-Antitrypsin Deficiency.
Lancet 2, 844-845 (1973)

9 Döring, G.K.: Physiologie der Schwangerschaft und des Fetus.
In: Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Band 3, Urban & Schwarzenberg, München/Wien/Baltimor, 1978

10 Duck, H.-J., K. Ebeling und J. Wagner:

Die Hemmkapazität des Serums für proteolytische Enzyme.
Dtsch.Ges.wesen 25, 1545-1549 (1970)

11 Ebeling, K., H.-J. Duck und J. Wagner:

Hemmkapazität für proteolytische Enzyme im Nabelschnurvenenblut nach normalem und pathologischem Geburtsverlauf.
Zbl.Gynäk. 18, 583-588 (1972)

12 Erikkson, S.: Studies in α_1-Antitrypsin Deficiency.
Acta Med.Scand. 432 Suppl., 1-85 (1965)

13 Erikkson, S. and I. Hägerstrand:

Cirrhosis and Malignant Hepatoma in α_1-Antitrypsin Deficiency.
Acta Med.Scand. 195, 451-458 (1974)

14 Erikkson, S. and Ch. Larsson:

Purification and Partial Characterization of Pas-Positive Inclusion Bodies from the Liver in α_1-Antitrypsin Deficiency.
Engl.J.Med. 292, 176-180 (1975)

15 Erlanger, B.F., N. Kokowsky and W. Cohen:

The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin.
Archives of Biochemistry and Biophysics 95, 271-278 (1961)

16 Faarvang, H.J. and O.S. Lauritzen:

Increase of Trypsin Inhibitor in Serum during Pregnancy.
Nature 199, 290-291 (1963)

17 Fagerhol, M.K. and M. Braend:

Serum Prealbumins: Polymorphism in Man.
Science 149, 986-987 (1965)

18 Fagerhol, M.K. and C.B. Laurell:

The Pi-System Inherited Variants of Serum α_1-Antitrypsin.
In: Progress of Human Genetics.
Hrsg.: A.G. Steinberg. Bern, New York: Grune & Stratton, 1970 (96-111)

19 Fagerhol, M.K. and C.B. Laurell:

The Polymorphism of "Prealbumins" and α_1-Antitrypsin in Human Sera.
Clin.Chim.Acta 16, 199-203 (1967)

20 Fischer, M.: Verhalten menschlicher Plasmininhibitoren bei intravasal erhöhter fibrinolytischer Aktivität.
Thrombos.Diathes.haemorrh. 23, 513-552 (1970)

21 Fritz, H., G. Hartwich und E. Werle:

Isolierung und Charakterisierung des Trypsininhibitors aus Pankreasgewebe und Pankreassekret vom Hund.
Hoppe-Seylers f. physiol. Chemie 345, 150-167 (1966)

22 Fritz, H., I. Trautschold und E. Werle:

Protease-Inhibitoren.
In: Methoden der enzymatischen Analyse.
Hrsg.: H.U. Bergmeyer, Weinheim: Verlag Chemie,1970 (1021-1032)

23 Fritz, H., F. Woitinas und E. Werle:

Isolierung und Charakterisierung von Protease-Inhibitoren aus den Bauchspeicheldrüsen verschiedener Wirbeltiere und des Menschen.
Hoppe-Seylers f. physiol. Chemie 345, 168-180 (1966)

24 Ganrot, P.O. and B. Bjerre:

α_1-Antitrypsin and α_2-Macroglobulin Concentration in Serum during Pregnancy.
Acta obst. et gynec.scand. 46, 126-137 (1967)

25 Geisler, L.S., G.W. Bachmann, F. Laumen, D. Nolte, H. Wentzel und H.-D. Rost:

α_1-Antitrypsin und Immunglobuline bei chronisch unspezifischen Lungenerkrankungen und Lungentuberkulose.
Dtsch.med.Wschr. 97, 329-335 (1972)

26 Gherardi, G.I.: α_1-Antitrypsin Deficiency and its Effects on the Liver.
Human Pathol. 2, 173-175 (1971)

27 Haverback, B.J., B. Dyce. H. Bundy and H.A. Edmondson:

Trypsin, Trypsinogen and Trypsin Inhibitor in Human Pancreatic Juice.
Amer.J.Med. 29, 424-433 (1960)

28 Heide, K., N. Heimburg and H. Haupt:

An Alpha-Inhibitor of Human Serum.
Clin.chim.Acta 11, 82-85 (1965)

29 Heimburg, N., und H. Haupt:

Zur Spezifität der Antiproteinasen des Humanplasmas für Elastase.
Klin.Wschr. 20, 1196-1199 (1966)

30 Heimburg, N., H. Haupt and H.G. Schwick:

Proteinase Inhibitors of Human Plasma.
In: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors Munich 1970. Hrsg.: H. Fritz und H. Tschesche. Berlin, New York: de Gruyter 1971

31 Heimburg, N., H. Haupt and H.G. Schwick:

The Physiological Importance of the Inhibitors.
In: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors Munich 1970. Hrsg.: H. Fritz und H. Tschesche. Berlin, New York: de Gruyter 1971

32 Hennemann, H.H. und W.G. Stocker:

α_1-Antitrypsin-Mangel mit juvenilem Lungenemphysem.
Dtsch.med.Wschr. 6, 255-258 (1973)

33 Herschlein, H.J. und D.F. Steichele:

Unterschiedliche Formen der Verbrauchskoagulopathie und ihre Behandlung.
Med.Welt 44, 2389-2398 (1969)

34 Heuckenkamp, P.-U., J. Meier und N. Zöllner:

Die Trypsinhemmung in unausgewählten Sera eines poliklinischen Patientengutes.
Pneumonologie 148, 303-309 (1973)

35 Hirschhäuser, C., M. Kionke, E. Daume and R. Buchholz:
Trypsin Inhibitors in the Human Female Genital Tract.
Acta endocr. 68, 413-416 (1971)

36 James, K., F.B. Taylor and H.H. Fudenberg:
Trypsin Stabilizers in Human Serum. The Role of α_2-Macroglobulin.
Clin.Chim.Acta 13, 359-368 (1966)

37 Karitzky, D., H. Wehinger, J. Witt und K. Kabus:
Alpha$_1$-Antitrypsinmangel.
Diagnostik 4, 218-220 (1971)

38 Kuhlenschmidt, M.S., E.J. Yunis, R.M. Immarino et al.:
Demonstration of Sialtransderase Deficiency in Serum of Patients with α_1-Antitrypsin Deficiency and Hepatic Cirrhosis.
Lab.Invest. 31, 413-419 (1974)

39 Kuhn, W. und H. Graeff:
Gerinnungsstörungen in der Geburtshilfe.
1. Aufl., Stuttgart: Thieme 1977

40 Kunz, N.N.: Immunologische Untersuchungen über das antifibrinolytische Potential in der Schwangerschaft.
Frühjahrstagung der oberrheinischen Gesellschaft für Gyn. und Geb., Konstanz, Mai 1973

41 Küppers, E.: α_1-Antitrypsin: Physiology, Genetics and Pathology.
Humangenetik 11, 177-189 (1971)

42 Küppers, E., R. Fallat and R.K. Larson:
Obstructive Lung Disease and α_1-Antitrypsin Deficiency Gene Heterocygosity.
Science 165, 899-901 (1969)

43 Laurell, C.B.: Electrophoretic and Electroimmunochemical Analysis of Proteins.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 124 Suppl., 1-136 (1972)

44 Laurell, C.B. and S. Erikkson:
The Electrophoretic of Globulin Pattern of Serum in α_1-Antitrypsin Deficiency.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 15, 132-140 (1963)

45 Laurell, C.B. and S. Erikkson:

The Serum α_1-Antitrypsin in Families with Hypo-α_1-Antitrypsin-Emia.
Clin.chim.Acta 11, 395 (1965)

46 Liebermann, J.: Heterozygous and Homozygous α_1-Antitrypsin Deficiency in Patients with Pulmonary Emphysema.
Engl.J.Med 281, 279-284 (1969)

47 Liebermann, J. and J.R. Kent:

Effect of Diethylstilbesterol upon α_1-Antitrypsin Activity.
Clin.Res. 18, 191 (1970)

48 Liebermann, J., C. Mittman and H.W. Gordon:

Alpha$_1$-Antitrypsin in Livers of Patients with Emphysema.
Science 175, 63-65 (1972)

49 Martin, J.P.: Le système Pi et les états déficitaires en alpha-1-antitrypsine.
Nouv. Presse med. 36, 2375-2377 (1973)

50 Meiers, H.G., D. Beisenherz, H. Brüster, D. Strassburger und H. Greuel:

α_1-Antitrypsin-Defekt und Lungenemphysem.
Dtsch.med.Wschr. 35, 1633-1636 (1958)

51 Mendenhall, H.W.:

Effect of Oral Contraceptives on Serum Protein Concentrations.
Am.J.Obstet.Gynec. 106, 750-753 (1970)

52 Métais, P., H. Schirardin et J. Warter:

Mesures de la capacité d'inhibition trypsique du sérum humain.
Clin.chim.Acta 13, 602-610 (1966)

53 Morse, J.O., M.D. Lebowitz, R.J. Knudson and B. Burrows:

A Community Study of the Relation of Alpha$_1$-Antitrypsin Levels to Obstructive Lung Disease.
Engl.J.Med. 292, 278-281 (1975)

54 Nagel, W. und F. Willig:

Proteolytische Enzyme im Pankreas unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Klin.Wschr. 8, 400-402 (1964)

55 Nagel, W., F. Willig, W. Peschke und F.H. Schmidt:
Über die Bestimmung von Trypsin und Chymotrypsin mit Aminosäure-p-Nitroaniliden.
Hoppe-Seylers f. physiol. Chemie 340, 1-10 (1965)

56 Pierce, J.A.: More on Antitrypsin.
Engl.J.Med. 287, 1095-1096 (1972)

57 Proksch, G.J., J. Lane and C.D. Nordschow:
Interrelation of the Urinary Trypsin Inhibitor to Human Plasma Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor.
Clin.Biochem. 6, 200-206 (1973)

58 Reinharz, A. and M. Roth:
Studies on the Trypsin-like and the Trypsin-inhibiting Properties of Human Serum.
Enzymol.biol.clin. 5, 113-123 (1965)

59 Rick, W.: Trypsin.
In: Methoden der enzymatischen Analyse.
Hrsg.: H.U. Bergmeyer. Weinheim: Verlag Chemie 1970 (974-984)

60 Schäfer, K.-D. und H. Donat:
Plasmafibrinogenspiegel in der Schwangerschaft.
Zbl.Gynäk. 18, 577-582 (1972)

61 Schultze, H.E., K. Heide und H. Haupt:
α_1-Antitrypsin aus Humanserum.
Klin.Wschr. 40, 427-429 (1962)

62 Steichele, D.F. und H.J. Herschlein:
Grundlagen und Therapie der akuten Gerinnungsstörungen in Geburtshilfe und Chirurgie.
Med.Welt 34, 1931-1939 (1967)

63 Talamo, R.C., C.E. Langley, B.W. Cevine and H. Kazemi:
Genetic vs. Quantitative Analysis of Serum Alpha$_1$-Antitrypsin.
Engl.J.Med. 287, 1067-1069 (1972)

64 Underwood, J.C.: Diagnosis of Alpha$_1$-Antitrypsin Deficiency.
Lancet 1975 II, 1203-1204

65 Weiser, M.M., J.T. Lamont and W.A. Walker:

α_1-Antitrypsin Deficiency - A Defect of Secretion.
Engl.J.Med. 292, 205-206 (1975)

Lebenslauf

Am 28. Dezember 1942 wurde ich, Archibald Fridrich, als Sohn des Dipl.Ing. Alfred Fridrich und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Hertlein, in Stuttgart geboren.

Von 1949 bis 1953 besuchte ich in Stuttgart die Grundschule, im Anschluß daran das Gymnasium, das ich 1960 mit dem Zeugnis der Mittleren Reife verließ, um eine Lehre als Elektromechaniker zu absolvieren. 1963 legte ich die Gesellenprüfung ab. Nach entsprechender Vorbereitungszeit kehrte ich 1964 auf das Gymnasium zurück, das ich bis zur Reifeprüfung im Oktober 1966 besuchte.

Im Wintersemester 1966/67 nahm ich das Studium an der Universität Tübingen auf. Nach einem Semester Biologie begann ich im Sommersemester 1967, ebenfalls in Tübingen, mit dem Medizinstudium. Hier legte ich 1970 die ärztliche Vorprüfung und am 2. August 1973 das medizinische Staatsexamen ab.

Anschließend war ich Medizinalassistent in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik, Tübingen, und im Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart. Die Approbation als Arzt erhielt ich am 14. April 1975. Nach der Medizinalassistentenzeit arbeitete ich ein Jahr als Assistent am Institut für Klinische Pharmakologie des Robert-Bosch-Krankenhauses, Stuttgart. Seit 15. Mai 1976 bin ich als Assistenzarzt auf der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe dieses Krankenhauses tätig.

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
Forststraße 58, 7000 Stuttgart 1
Telefon (0711) 61 06 41

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
Forststraße 58, 7000 Stuttgart 1
Telefon (0711) 61 06 41